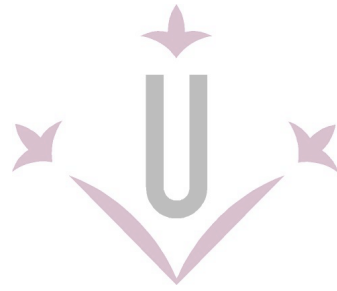


Universitat de Lleida  
Facultat de Medicina  
Grau en Nutrició Humana i Dietètica



# **Determinació de la bioaccessibilitat ‘in vitro’ dels carotenoides del tomàquet: efecte del grau de maduresa i de l’addició de lípids**

---

**SARA HERNÁNDEZ ROSELL**

**Lleida, 2015**

# **Determinació de la bioaccessibilitat ‘in vitro’ dels carotenoides del tomàquet: efecte del grau de maduresa i de l’addició de lípids**

Treball Fi de Grau presentat per: Sara Hernández Rosell

Tutor: Robert Soliva Fortuny

Co-tutor: Sandra González Casado

# Índex

<b>Resum</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducció</b>	<b>7</b>
1.1. Característiques i composició del tomàquet	7
1.2. Antioxidants	8
1.3. Aspectes generals dels carotenoides	9
1.3.1. Propietats	11
1.3.2. Paper dels carotenoides sobre la salut	12
1.3.3. Metabolisme, absorció i transport	12
1.4. Digestions in vitro	13
1.5. Efectes de la matriu i el processat de l'aliment sobre la bioaccessibilitat	16
<b>2. Hipòtesi</b>	<b>19</b>
<b>3. Objectius</b>	<b>20</b>
3.1. Generals	20
3.2. Específics	20
<b>4. Metodologia</b>	<b>21</b>
4.1. Mostres	21
4.1.1. Preparació de les mostres seleccionades	21
4.1.2. Caracterització de les mostres	22
4.2. Digestió gastrointestinal <i>in vitro</i>	23
4.3. Extraccions	24
4.4. Determinacions	26
4.4.1. Licopè	26

4.4.2. Carotenoides totals	27
4.4.3. Capacitat antioxidant lipofílica	27
4.5. Bioaccessibilitat	29
4.6. Anàlisi estadístic	29
<b>5. Resultats i Discussió</b>	<b>30</b>
5.1. Caracterització del tomàquet	30
5.2. Efecte del grau de maduresa del fruit sobre la bioaccessibilitat del licopè i carotenoides totals del tomàquet	31
5.3. Influència de l'addició i tipus de lípids en la bioaccessibilitat dels carotenoides del tomàquet	33
5.3.1. Carotenoides totals	33
5.3.2. Lycopè	34
5.4. Capacitat antioxidant lipofílica	36
<b>6. Conclusions</b>	<b>38</b>
<b>7. Referències bibliogràfiques</b>	<b>39</b>
<b>8. Annex</b>	<b>45</b>

## Resum

El consum d'aliments rics en carotenoides està associat a una disminució del risc a patir malalties cardiovasculars i degeneratives. Però la capacitat dels carotenoides per solubilitzar-se en les micelles del intestí durant la digestió és molt limitada. Aquest estudi avalua la influència de tres estats de maduresa del tomàquet i l'addició de diferents olis (oliva, gira-sol i coco) sobre la bioaccessibilitat, i capacitat antioxidant lipofílica, de carotenoides totals i licopè mitjançant la digestió *in vitro*. La bioaccessibilitat es va calcular quantificant la fracció de compostos que s'alliberaren de la matriu alimentària i s'incorporaren en la fase micel·lar. La maduració va tenir un efecte significatiu en la bioaccessibilitat dels carotenoides totals i licopè i en la capacitat antioxidant. Els valors de bioaccessibilitat més alts s'observaren per als tomàquets més madurs. L'addició de lípids, abans de la digestió, va augmentar la bioaccessibilitat significativament, però no va tenir repercussió sobre la capacitat antioxidant. Encara que el tipus de lípid no va tenir efectes significatius en la bioaccessibilitat dels carotenoides i en la capacitat antioxidant lipofílica, els valors més alts es van obtenir en les mostres amb addició d'oli d'oliva. En conclusió, el grau de maduresa i la presència de lípids incrementen la bioaccessibilitat dels carotenoides totals i licopè, la qual cosa podria comportar un augment de la biodisponibilitat d'aquests compostos.

Paraules clau: tomàquet, digestió *in vitro*, bioaccessibilitat, carotenoides, licopè.

## Resumen

El consumo de alimentos ricos en carotenoides, como el tomate, está asociado con la disminución del riesgo a enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Pero la capacidad de los carotenoides para solubilizarse en las micelas del intestino durante la digestión es limitada. El presente estudio evalúa la influencia de tres estados de madurez del tomate y la adición de diferentes aceites (oliva, girasol y coco) sobre la bioaccesibilidad y capacidad antioxidante lipofílica, de los carotenoides totales y licopeno mediante digestión *in vitro*. La bioaccesibilidad se cuantificó como la fracción de compuestos que se liberaron de la matriz alimentaria y se incorporaron en las micelas. La maduración tuvo un efecto beneficioso en la bioaccesibilidad de los carotenoides totales y licopeno, como en la capacidad antioxidante. Los valores de bioaccesibilidad más altos se obtuvieron para los tomates más maduros. La adición de lípidos antes de la digestión aumentó la bioaccesibilidad, pero no influyó en la capacidad antioxidante. Aunque el tipo de aceite no tuvo efectos significativos sobre la bioaccesibilidad de los carotenoides y en la capacidad antioxidante lipofílica, los valores más altos se obtuvieron en las muestras con incorporación de aceite de oliva. En conclusión, el grado de madurez y la presencia de lípidos incrementan la bioaccesibilidad de carotenoides y licopeno, lo que podría influir positivamente en la biodisponibilidad de estos compuestos.

Palabras clave: tomate, digestión *in vitro*, bioaccesibilidad, carotenoides, licopeno

## **Abstract**

Consumption of foods rich in carotenoid such as tomato is associated with a decrease of the risk of developing certain cardiovascular and degenerative diseases. However, the ability of carotenoids to solubilize into the intestinal micelles during the digestion process is very low. The aim of this study was to evaluate the influence of three maturity stages and the addition of different types of oil (olive, sunflower and coconut) on the bioaccessibility and lipophilic antioxidant capacity of total carotenoids and lycopene from tomatoes through an in vitro digestion. Bioaccessibility was calculated by quantifying the portion of compounds released from the food matrix and incorporated to the micellar fraction. Ripening had a beneficial effect on the bioaccessibility of total carotenoids and lycopene, and also on the lipophilic antioxidant capacity. The highest bioaccessibility values were observed in the fully ripe estate. Addition of oil before digestion, increased the bioaccessibility but showed no influence on the antioxidant capacity. Although the type of lipid had no significant effects on the bioaccessibility of carotenoids and on the lipophilic antioxidant capacity, samples with addition of olive oil exhibited the highest values. In conclusion, both ripening process and presence of oil significantly improved total carotenoids and lycopene bioaccessibility from tomatoes, which could indicate an increase in the bioavailability of these compounds.

Key words: tomato, in vitro digestion, bioaccessibility, carotenoids, lycopene.

## 1. Introducció

Al llarg dels últims anys, la discussió sobre els efectes saludables de la Dieta Mediterrània sobre la població és un tema àmpliament opinat. En comparació amb altres països, la zona del Mediterrani presenta les taxes de mortalitat per causa de malalties cardiovasculars o càncer més baixes. Es reconeix que part d'aquests efectes promotors de la salut s'atribueixen al alt contingut en nutrients com la fibra, les vitamines, els àcids grassos poliinsaturats  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6, i els àcids grassos monoinsaturats que contenen els aliments que formen la base d'aquesta dieta (Estruch et al., 2013; Martínez-Huélamo et al., 2014).

Els compostos bioactius presents en les fruites i hortalisses són reconeguts com a part fonamental d'aquesta dieta, i l'associació d'alguns d'ells amb la disminució del risc a patir certes malalties degeneratives, cardiovasculars o bé càncer, ha despertat el seu interès (Martínez-Huélamo et al., 2014). Es defineixen com components dels aliments que influeixen positivament en l'activitat cel·lular, capaços de modular els processos metabòlics del organisme contribuint en benefici de la salut (Martínez & Carbajal, 2012; Carbonell-Capella et al., 2014). Es troben principalment en fruites i hortalisses en quantitats molt petites, entre aquests compostos destaquen els fitosterols i els carotenoides, i especialment el licopè, pigment que li proporciona el color característic al tomàquet.

### 1.1 Característiques i composició del tomàquet

El tomàquet, *Lycopersicum spp*, és un fruit originari d'Amèrica del Sud, concretament de la zona nord dels Andes, i domesticat a Mèxic. A finals del segle XV es va introduir a Europa, i durant les posteriors dècades el cultiu de tomàquet es va expandir per la regió del Mediterrani essent un producte totalment acceptat com a fruit comestible (Jones et al., 2001). Actualment, el seu cultiu i consum estan àmpliament distribuïts arreu del món i es consumeix fresc o processat, de fet, és el segon vegetal més consumit a nivell mundial amb 12 kg/any i persona (Lugasi et al., 2003). El processat del tomàquet deriva en una diversa gama de productes bàsics en la gastronomia actual, com la salsa de tomàquet, sucs, sopes i conserves vegetals.



En quant a composició i valor nutricional del tomàquet i els seus derivats, destaca el contingut en vitamina C i potassi (Taula 1). També per un alt contingut en carotenoides, principalment el licopè, pigment natural que proporciona la coloració vermella als fruits i considerat un dels majors antioxidants amb funcions protectores sobre l'organisme.

**Taula 1. Composició nutricional del tomàquet madur cru.** Taules de composició d'aliments del CESNID (Centre d'Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica), 2004. Valor nutricional per cada 100g de porció comestible. Els valors són genèrics i aproximats, poden variar en funció de la varietat del tomàquet.

Components					
Energia	19	kcal	Fòsfor	22	mg
Aigua	93,9	g	Zinc	0,2	mg
Proteïna	0,9	g	Iode	7	µg
Lípids	0,1	g	Vitamina A	74	µg
Glúcids	3,5	g	Vitamina B1	0,06	µg
Fibra	1,1	g	Vitamina B2	0,04	µg
Sodi	18	mg	Vitamina B3	0,80	µg
Potassi	236	mg	Àcid fòlic	29	µg
Calci	11	mg	Vitamina C	19	µg
Ferro	0,5	mg	Vitamina E	0,89	µg
Magnesi	10	mg	Carotenoides	443	µg

## 1.2. Antioxidants

Es considera antioxidant qualsevol molècula amb la capacitat de prevenir o evitar l'oxidació d'una altra. En l'oxidació té lloc la transferència d'electrons entre un agent oxidant i un substrat oxidable. En aquesta reacció es produeixen radicals lliures, substàncies amb un electró desaparellat, que inicien reaccions en cadena danyant les cèl·lules del organisme (Segura, 2014). El paper dels antioxidants en aquesta situació és neutralitzar els radicals lliures i bloquejar la propagació de les reaccions en cadena oxidant-se ells mateixos, és a dir, cedint els seus electrons. El desequilibri entre la producció de radicals lliures, principalment espècies

reactives d'oxigen (ERO), i la capacitat per neutralitzar el dany produït ocasiona l'estrès oxidatiu. Esta demostrat que aquesta condició d'estrès oxidatiu està involucrada en diferents malalties cardiovasculars i degeneratives (Pingitore et al., 2015).

Els antioxidants naturals no enzimàtics es troben en aliments com la fruita, la verdura i els cereals, una de les causes de que el consum diari d'aquests grups d'aliments sigui tant important. També es troben en proporcions destacades en les plantes aromàtiques o espècies emprades en la cuina. El seu ús s'estén en diversos camps, en la indústria alimentària s'utilitzen com a conservants per evitar la degradació oxidativa que afecta a la qualitat organolèptica, nutricional i sanitària del producte, i perllongar la seva vida útil. En la farmacologia, també tenen la seva implicació degut a la relació existent entre l'estrès oxidatiu i les patologies associades.

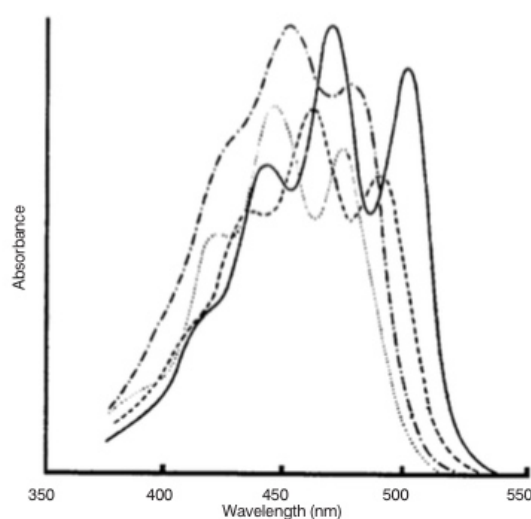
Depenent de la solubilitat dels antioxidants, els podem classificar en dos grups; hidrosolubles i liposolubles. Els hidrosolubles, principalment vitamina C i compostos fenòlics, actuen en el citoplasma cel·lular i el plasma sanguini. Els liposolubles, destaquen la vitamina E i els carotenoides, i intervenen en la auto-oxidació lipídica de les membranes cel·lulars.

### **1.3 Aspectes generals dels carotenoides**

Els carotenoides són pigments orgànics d'origen vegetal que es troben en els cromoplasts de les plantes i alguns organismes fotosintètics, com certs bacteris i fongs. Generalment, no poden ser sintetitzats per espècies d'origen animal, han de ser ingerits a través de la dieta, fonamentalment a partir de fruites, verdures i hortalisses (Rodríguez-Amaya 2001).

Estructuralment, formen part de la família dels isoprenoides, ja que estan formats per la unió de 8 d'aquests donant lloc a un tetraterpenoides, molècula de 40 àtoms de carboni. La ciclació, hidrogenació i deshidrogenació, escurçament o extensió de la cadena, isomerització, migració del doble enllaç i altres modificacions o combinacions d'aquests processos resulten en una gran varietat

d'estructures que donen lloc als diferents tipus de carotenoides, més de 700 fins ara coneguts (Rodríguez-Amaya, 2001; Yahia i Ornelas-Paz, 2009). A més, poden presentar-se en diverses conformacions *cis/trans*, encara que la més estable i present en la naturalesa és la *trans* (García-Valverde et al., 2011). La característica més destacable d'aquests compostos, és la capacitat que tenen de reflectir i transmetre la llum visible, i ho fan gràcies al cromòfor que absorbeix la llum a diferents longituds d'ona (Rodríguez-Amaya, 2001). El cromòfor forma part de l'estructura molecular dels carotenoides, és un sistema de dobles enllaços conjugats responsable de reflectir la coloració groga, taronja i vermella de les diferents fruites i verdures presents en la nostra dieta, la Dieta Mediterrània.



**Figura 1. Espectre d'absorció dels carotenoides.** Licopè (línia contínua).

Així, els diversos tipus de carotenoides existents en la naturalesa es diferencien principalment en petits detalls de la seva estructura molecular que fan que absorbeixin longituds d'ona diferents i per tant, tinguin una capacitat de coloració diferent. La majoria dels carotenoides tenen la màxima absorció a tres longituds d'ona diferent, resultant en un espectre de tres pics característic dels carotenoides. Per posseir un color perceptible, es necessiten almenys 7 dobles enllaços. Per aquest motiu, el licopè amb 11 insaturacions és vermell i absorbeix a les longituds d'ona més llargues ( $\lambda_{\text{màx}}$  A 444, 470 i 520nm), (Figura 1).

En termes generals, actualment els carotenoides es classifiquen en dos grans grups;

- Carotens. Estrictament hidrocarburs, és a dir, formats únicament per la unió d'àtoms de carboni i hidrogen. En destaca el licopè, principal pigment dels fruits de polpa vermella com el tomàquet o la síndria, el  $\beta$ -carotè àmpliament diversificat entre fruites i verdures mentre que el  $\alpha$ -carotè el trobem principalment en la pastanaga i la carabassa, i en menors quantitats acompanyant al  $\beta$ -carotè.
- Xantofil·les. Són els derivats oxigenats dels carotens. Contenen àtoms d'oxigen en la seva estructura. Destaquen la  $\beta$ -criptoxantina, principal pigment dels fruits de polpa taronja i la luteïna, que es troba en el rovell de l'ou i en els teixits de les plantes i és el carotenoide predominant de les fulles, vegetals verds i algunes flors (Mínguez-Mosquera, 2005).

### 1.3.1 Propietats

Són moltes les propietats físico-químiques que s'atribueixen als carotenoides, les principals són absorbir la llum, captar l'oxigen singlet i inhibir la propagació en cadena dels radicals lliures i les espècies reactives d'oxigen (Huo et al., 2007). Aquesta última propietat està relacionada amb l'estructura de doble enllaç, i la màxima protecció ve donada per aquells carotenoides que contenen més de 9 insaturacions (Foote et al., 1970), com el licopè, considerat d'elevada capacitat antioxidant.

Altres propietats són l'elevada predisposició a isomeritzar-se i oxidar-se, atès que són compostos molt sensibles a l'oxigen, la temperatura, la llum, els àcids i els peròxids. També tenen facilitat per unir-se a substàncies hidrofòbiques perquè són insolubles en aigua. Degut a la seva naturalesa, es dissolen en solvents orgànics. Els carotens són més solubles en hexà i èter de petroli, mentre que les xantofil·les en metanol i etanol (Olmedilla-Alonso, 2001). Es pot dir que els carotens són més hidròfobs i les xantofil·les més hidròfiles.

### **1.3.2 Paper dels carotenoides sobre la salut**

Alguns dels carotenoides com el  $\beta$ -carotè o la  $\beta$ -criptoxantina, per motius estructurals, són precursors de la vitamina A. Vitamina important en l'etapa de creixement i desenvolupament de la funció immunològica. Però independentment de l'activitat provitamínica, els carotenoides també tenen capacitat antioxidant, inhibeixen el procés d'auto-oxidació lipídica i eviten la peroxidació de les LDL. A més, gràcies a la implicació que tenen en l'estrès oxidatiu, estan relacionats amb la prevenció i disminució del risc de patir malalties del sistema cardiovascular o malalties degeneratives, com el càncer (Rodríguez-Amaya, 1997; Alminger et al., 2014; Segura, 2014). I en el cas de la luteïna i la zeaxantina específicament en la disminució del risc de degeneració macular, que a la llarga pot causar cataractes o ceguera en la població de tercera edat (Mínguez-Mosquera, 2005).

### **1.3.3 Metabolisme, absorció i transport**

Dels carotenoides ingerits en la dieta, només una part molt reduïda estan disponibles per a ser absorbits i metabolitzats per l'ésser humà. Principalment perquè són compostos molt hidrofòbics per dispersar-se en el medi aquós del tracte digestiu. També perquè requereixen processos molt complexes, comuns amb altres tipus de micronutrients lipofílics, abans de poder ser absorbits a l'intestí (Anese et al., 2015).

Així, els carotenoides, primer han d'alliberar-se de la matriu alimentària i dispersar-se en el medi del tracte digestiu (Nagao et al., 2013; Huo et al., 2007). A la boca, es redueixen les partícules de l'aliment per acció de la mastiació, fet que provoca el trencament de la paret cel·lular de l'aliment i afavoreix l'alliberament. A l'estómac, la presència de lípids ingerits en la mateixa dieta afavoreixen la dispersió dels carotenoides i la seva emulsió. Cal mencionar que al llarg del tracte digestiu, l'acció enzimàtica i dels àcids dels suc digestius, provoquen la hidròlisi dels hidrats de carboni, proteïnes i lípids i també contribueixen a l'alliberament dels carotenoides de la matriu (Yahia i Ornelas-Paz, 2009) i a la seva solubilització.

Una vegada són alliberats, necessiten dissoldre's en partícules lipídiques. Al duodè, primera porció del intestí, desemboquen les secrecions pancreàtica i biliar

que ajuda a emulsionar els lípids en petites gotes lipídiques facilitant la solubilització dels carotenoides en micel·les. Aquesta etapa del procés és clau en l'absorció, ja que només els carotenoides que formin micel·les seran els absorbits pels enteròcits. L'eficiència de formació de micel·les en la fase aquosa s'utilitza com una estimació de la bioaccessibilitat dels carotenoides (Furr i Clark, 1977; Granado-Lorencio et al., 2007).

És a l'enteròcit on els carotenoides, junt amb altres molècules lipofíliques, s'incorporen als quilomicrons per ser transportats, a través del sistema limfàtic, al fetge, principal destí dels carotenoides. Des d'aquí es distribueixen als diferents teixits a través de les lipoproteïnes. Els carotens, com el licopè i el  $\beta$ -carotè, són transportats per les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) i baixa densitat (LDL) mentre que les xantofil·les són transportades per les lipoproteïnes d'elevada densitat (HDL) (Furr i Clark, 1977; Faulks i Southon, 2005).

En els humans, la concentració total de carotenoides en plasma sanguini és molt baixa ( $<1\mu\text{mol/L}$ ), i aproximadament el 90% estan representats per  $\beta$ -carotè,  $\alpha$ -carotè, licopè,  $\beta$ -criptoxantina, luteïna i zeaxantina (Martínez i Carbajal, 2012; Benzie i Wachtel-Galor, 2013).

#### **1.4 Digestions *in vitro***

La quantitat total de compostos fitoquímics, com els carotenoides, que ingerim a través de la dieta no necessàriament es veu reflectida en la concentració d'aquests en sang o teixits, és degut a la seva biodisponibilitat. Aquest terme es refereix a la quantitat de carotenoides que són absorbits a la mucosa del intestí i passen al nostre organisme. En general, el procés d'absorció dels carotenoides és molt complex, ja que la biodisponibilitat dels fitoquímics es veu afectada per diferents factors de tipus químic, biològic, fisiològic o inclús nutricional.

Lligada a la biodisponibilitat es troba la bioaccessibilitat, definida com la fracció de nutrient que s'allibera de la matriu alimentària que el conté, es modifica estructuralment i es solubilitza amb les micel·les per tal de poder ser absorbit. Però no tota la fracció bioaccessible esdevé biodisponible, és a dir, s'absorbeix

per l'intestí. Per tant, la bioaccessibilitat es converteix en el requisit previ i essencial per la biodisponibilitat d'un compost. (Parada i Aguilera, 2007; Carbonell-Capella et al., 2014).

Els carotenoides, són substàncies que tenen baixa capacitat per alliberar-se de la matriu i solubilitzar-se, i a més són fàcilment degradables. Per consegüent, la fracció que esdevé bioaccessible pot estar per sota del 10%. Per tant, les investigacions enfocades a l'estudi dels canvis que es produeixen durant el procés digestiu són crucials per entendre i avaluar la biodisponibilitat i bioaccessibilitat d'un compost. Ja que, només la fracció bioaccessible d'un carotenoide podrà ser absorbida i exercir els seus efectes beneficiosos sobre la salut (Bouayed et al., 2011; Alminger et al., 2014).

Sabem de l'existència de diferents mètodes, a curt i llarg termini, per estimar la biodisponibilitat de carotenoides en humans i animals *in vivo*. Un dels mètodes seria mesurant l'increment de carotenoides en plasma després d'haver administrat dosis d'aquests. O bé, el mètode de la balança oral-fecal que compara la quantitat de carotenoides ingerits amb els excretats (Rodríguez-Amaya, 2001). Però els mètodes *in vivo*, tot i que proporcionen els resultats més precisos són molt relatius degut a la variabilitat individual, requereixen temps, resulten cars i costos, no són útils per una gran quantitat de mostres i la majoria es veuen limitats per aspectes ètics (Hedré et al., 2002).

No obstant això, existeix el mètode *in vitro* que simula el procés de la digestió per poder estimar la quantitat de carotenoides que esdevenen bioaccessibles a l'intestí. Aquest mètode permet fer estudis amb un gran nombre de mostres, concedeix l'estudi de factors per separat i combinats en cada etapa de la digestió, està lliure de limitacions ètiques i la inversió de temps sol ser menor. Tanmateix, els resultats que s'obtenen per aquests mètodes mai podran competir amb la precisió dels obtinguts per digestió *in vivo* a causa de la complexitat inherent del procés fisiològic (Coles et al., 2005).

Cal afegir que, la gran diversitat de models existents per a digestions *in vitro* es converteix en un obstacle alhora de comparar resultats perquè augmenta la possibilitat de controvèrsies. Actualment, no existeix cap model per a digestions *in vitro* acceptat i estandarditzat. Tots els models parteixen de diferències importants depenent de l'objectiu que es persegueix. També del component específic de l'aliment analitzat, la naturalesa de la matriu de l'aliment i la complexitat del model de digestió (Hur et al., 2011).

Una de les propietats físico-químiques del component específic a analitzar que té gran influència sobre el model de digestió *in vitro* és la solubilitat en aigua o lípids ja que, l'absorció d'un compost liposoluble difereix a la d'un hidrosoluble. Els carotenoides requereixen un trencament de la matriu per poder ser alliberats i emulsionar-se amb petites gotes lipídiques presents en la fase gàstrica de la digestió, que posteriorment s'incorporaran a les micelles en la fase intestinal per poder ser absorbides. En canvi, els compostos hidrofílics depenen d'altres factors com la mida de les partícules, la capacitat per formar enllaços amb altres compostos, el pH o l'afinitat per altres proteïnes presents en la matriu (Alminger et al., 2014).

Per últim, la complexitat del model dependrà de:

- Les fases incloses de la digestió; oral, gàstrica i intestinal menor i major.
- La composició dels fluids digestius emprats en cada fase; enzims, sals biliars, concentració d'electròlits, etc.
- El nombre de mostres.
- Paràmetres que es volen analitzar.
- Model estàtic o dinàmic; l'objectiu de la investigació condiciona en gran part si un model serà estàtic o bé dinàmic. Els models estàtics permeten analitzar grans quantitats de mostres a diferència dels models dinàmics, que degut a la seva complexitat permeten analitzar un nombre reduït de mostres.



## **1.5 Efectes de la matriu i el processat de l'aliment sobre la bioaccessibilitat**

Tot i que els compostos antioxidants, com els carotenoides, es troben de forma natural en el tomàquet, el seu contingut es pot veure influenciat per diferents factors. El tipus de cultiu i la varietat, les característiques del sòl, l'exposició a la llum, la temperatura, el grau de maduresa, els tractaments post-collita i el processat agroalimentari són els principals factors que determinaran la quantitat de carotenoides presents en el tomàquet (Martínez-Valverde et al., 2002; Dumas et al., 2003; Periago et al., 2009; Yahia i Ornelas-Paz, 2009) i en la majoria dels fruits.

El principal factor que afecta al contingut de carotenoides en fruites i hortalisses és el procés de maduració. La maduració d'un fruit és un procés que va acompanyat de canvis físics, metabòlics i en la expressió dels gens. Durant aquest, el contingut en carotenoides pot augmentar de valors no detectables a nivells elevats en només 20 dies. L'aparició dels carotenoides és degut a la presència d'etilè, gas a temperatura ambient i alhora hormona vegetal que desencadena el procés de maduració, aquesta etapa irreversible s'anomena climateri. Es degrada la clorofil·la i es sintetitzen els carotenoides (Zambrano et al., 1995; Yahia i Ornelas-Paz, 2009).

D'altra banda, el tipus de matriu alimentària, el processat i les interaccions durant la digestió i absorció amb altres compostos de la dieta, poden alterar la quantitat de carotenoides que s'alliberen de la matriu de l'aliment i conseqüentment modificar la bioaccessibilitat dels carotenoides presents (Alminger et al., 2014; Arranz et al., 2015).

En la matriu alimentària, els carotenoides es localitzen en els cromoplasts. Depenent de l'aliment que els conté els carotenoides es poden presentar de diferent manera. En els vegetals de fulla verda, com els espinacs, es troben en els cloroplasts, juntament amb les clorofil·les, formant complexos de proteïna-carotenoide. En fruites de coloració groga, taronja i vermella com la pastanaga o el tomàquet, es troben de forma cristal·lina. I en fruites com el mango i la papaia es troben solubilitzats en la fracció grassa en solució grassa de la fruita.

Sembla ser que els carotenoides que es troben units a proteïnes o formant cristalls s'absorbeixen en menor quantitat, en canvi els carotenoides que es troben en la matriu dissolts en gotes lipídiques són fàcilment absorbits (Yahia i Ornelas-Paz, 2009). Generalment, els carotenoides es concentren més en la pell que en la polpa (Gros 1987).

Les interaccions donades entre compostos bioactius i altres substàncies de la matriu poden ser d'exclusió, d'adició o sinèrgiques (Sun-Waterhouse, 2013). Per exemple, la vitamina E és una possible competidora en la fase d'absorció amb el licopè perquè ambdós compostos són lipofílics (Alminger et al., 2014).

En quant a l'efecte del processat sobre la bioaccessibilitat dels carotenoides, nombrosos estudis demostren que la bioaccessibilitat del licopè del tomàquet augmenta quan el producte és processat. L'homogeneïtzació i el tractament tèrmic comporten un trencament de l'estructura cel·lular de la matriu i aquest fet afavoreix l'alliberament dels carotenoides (Garrett et al., 2000; Richelle et al., 2002; Fielding et al., 2005). La susceptibilitat dels carotenoides per degradar-se o isomeritzar-se augmenta un cop són alliberats de la matriu. La reducció de partícules i la homogeneïtzació durant el processat també és un altre factor que contribueix a l'augment de la bioaccessibilitat, ja que també ajuda al trencament de la paret cel·lular del vegetal i permet l'alliberament dels carotenoides (Colle et al., 2013; Alminger et al., 2014). En l'actualitat, s'estan estudiant noves tecnologies en el processat que afavoreixin la preservació dels aliments. Com són els polsos elèctrics, que a la llarga podrien ser una alternativa als tractaments tèrmics convencionals (Vallverdú-Queralt et al., 2012).

A més, la presència d'una certa quantitat de lípids en la ingesta de carotenoides és un altre factor que influeix en la bioaccessibilitat dels carotenoides. (Ahuja et al., 2006). Els carotenoides, al ser substàncies lipofíliques tendeixen a unir-se amb la matèria més greixosa del aliment. Recentment, s'ha observat que la presència d'oli en una amanida contribueix a l'augment del contingut de licopè en plasma (Brown et al., 2004). Aquest fet també ha estat corroborat per altres estudis, on s'ha observat que la bioaccessibilitat dels carotenoides augmenta en presència de lípids i es afectada per la longitud de la cadena dels àcids grassos

però no pel grau d'insaturació (Fielding et al., 2005; Huo et al., 2007; Nagao et al., 2013).

Així doncs, el grau de maduresa, el tipus de matriu alimentària, la presència i interacció d'altres components i el processat de l'aliment, determinen en gran part la quantitat de carotenoides que s'allibera de la matriu, és a dir, la bioaccessibilitat i per consegüent la biodisponibilitat.

## **2. Hipòtesi**

El consum de fruites i hortalisses, aliments rics en carotenoides, és essencial en una dieta saludable i està associat a una disminució del risc de desenvolupar certes malalties cròniques i degeneratives, contribuint a una millora de la salut. Diferents organitzacions a nivell mundial com la OMS i la FAO recomanen un consum de almenys 400g per persona i dia, el equivalent a 5 peces al dia. Malauradament, segons l'informe de la OMS al 2003, una considerable part de la població mundial no assoleix les recomanacions diàries de fruites i hortalisses (Rodríguez-Roque, 2013).

Diferents estudis han demostrat que una ingesta regular de tomàquet o productes derivats tenen un efecte beneficiós sobre la salut, disminuint el risc de malalties cardiovasculars (Arranz et al., 2015). Les característiques de la matèria primera, el processat alimentari i les interaccions dels carotenoides associades a components lipofílics de la dieta poden modificar la bioaccessibilitat de compostos antioxidants per a l'organisme, i conseqüentment la biodisponibilitat.

### **3. Objectius**

#### **3.1 Generals**

L'objectiu general del present estudi és avaluar i comparar l'efecte de l'addició de lípids al tomàquet fresc sobre la bioaccessibilitat dels carotenoides, i especialment del licopè, mitjançant un model de digestió *in vitro*.

#### **3.2 Específics**

1. Dur a terme una caracterització físico-química del tomàquet fresc mitjançant els principals paràmetres de qualitat.
2. Determinar el contingut de carotenoides totals, licopè i capacitat antioxidant lipofílica en mostres de tomàquet fresc i sotmeses a un procés de digestió *in vitro*.
3. Avaluar la influència de l'addició de diferents tipus de lípids en la bioaccessibilitat dels carotenoides del tomàquet.
4. Avaluar l'efecte del grau de maduresa del fruit sobre la bioaccessibilitat dels carotenoides del tomàquet.

## 4. Metodologia

### 4.1 Mostres

#### 4.1.1 Preparació de les mostres seleccionades

Per a l'optimització dels mètodes analítics es va utilitzar el tomàquet *de rama* degut a la seva disponibilitat en el mercat i el seu baix cost. Posteriorment, per realitzar l'estudi, es va elegir la varietat *Raf* ja que és un tomàquet que es pot trobar en qualsevol època del any.

Els tomàquets van ser comprats en estat de maduresa verd-madur a un distribuïdor local, i es van emmagatzemar en cambres a 12°C de temperatura per afavorir la maduració desitjada. Els tomàquets utilitzats van ser seleccionats aleatòriament, i mitjançant la inspecció visual i el tacte es van rebutjar aquells amb lesions físiques i/o químiques. Per tal d'observar la influència de l'addició de lípids sobre la bioaccessibilitat del tomàquet es va seleccionar tres tipus d'olis amb composició en àcids grassos molt diversa, per poder tenir representació dels diferents graus d'insaturació. Així doncs, l'oli de gira-sol representa els àcids grassos poliinsaturats, el d'oliva els monoinsaturats i l'oli de coco representa els àcids grassos saturats (Taula 2).

**Taula 2. Composició en àcids grassos dels olis adicionats al tomàquet.** Taules de composició d'aliments del CESNID (Centre d'Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica), 2004. Composició per 100g de porció comestible. AGP/AGS ( $\geq 0,5$ ) i AGP+AGM/AGS ( $\geq 2$ ) són paràmetres de qualitat dels lípids.

	Gira-sol	Oliva	Coco
AGS	12,30 g	16,60 g	85,20 g
AGM	25,15 g	70,99 g	6,60 g
AGP	62,30 g	10,49 g	7,70 g
AGP/AGS	5,07	0,63	0,09
AGP+AGM/AGS	7,11	4,91	0,17

Es va preparar un experiment per cada grau de maduresa, resultant un total de 3 tipus de mostres inicials de tomàquet, les mostres seleccionades en estat verd-madur (1), en estat parcialment madur (2) i totalment madur (3), (Taula 3).

**Taula 3. Estats de maduresa del tomàquet.** Nomenclatura internacional i descripció segons el Departament d'Agricultura d'Estats Units (USDA).

Grau		Descripció
(1)	Verd madur <i>Mature-Green</i>	El tomàquet és completament verd, al 100%. Pot haver diferents tonalitats clares i fosques.
	Trencant <i>Breaking</i>	En el 10% o menys de la superfície hi ha un trencament del color verd a colors grocs, rosats i vermells.
	Canviant <i>Turning</i>	Entre el 10% i el 30% de la superfície presenta tonalitats grogues, rosades i vermelles.
(2)	Rosa <i>Pink</i>	Entre el 30% i el 60% de la superfície ja és de color rosa amb tonalitats vermelles.
	Vermell lleuger <i>Light red</i>	Entre el 60% i el 90% de la superfície ja és de color rosa amb tonalitats vermelles.
(3)	Vermell <i>Red</i>	Més del 90% de la superfície és de color vermell.

Els tomàquets seleccionats per cada experiment es van rentar, se'ls va eliminar la zona peduncular i es van tallar a daus de 1 cm<sup>3</sup> aproximadament. Posteriorment es van separar en quatre parts iguals, una per cada tipus d'oli; gira-sol (G), oliva (O) i coco (C). I una més per la mostra control o sense oli (NO). La quantitat d'oli a afegir es va fixar en un 5% del pes de la mostra inicial. De cada estat de maduresa i de cada tipus d'oli addicionat s'obtenien les mostres no digerides (ND) i les digerides (D) amb l'oli corresponent.

En ambdós casos es van liofilitzar les mostres resultants amb la finalitat de conservar-les fins al seu ús. Les extraccions i les determinacions es van fer per igual en les mostres de tomàquet ND i D, per tal d'obtenir el percentatge de bioaccessibilitat.

#### 4.1.2 Caracterització de les mostres

Cada mostra inicial va ser caracteritzada segons:

- Color. Es va determinar a través d'un colorímetre (Chroma Meter CR-400 KONICA MINOLTA SENSING, INC). Abans de processar els tomàquets es van realitzar les lectures sobre la línia equatorial de la superfície per obtenir paràmetres segons l'escala de CIE: L\*, a\* i b\*.

- b) Acidesa total. Per determinar l'acidesa del tomàquet es va fer una valoració amb NaOH 0,1M amb mostra de tomàquet fins assolir un pH de 8,1. Els resultats es van expressar en equivalents d'àcid cítric.
- c) Sòlids solubles. La quantitat de sòlids solubles de la mostra es va realitzar a través d'un refractòmetre (ATAGO R-X 1000), prèviament calibrat amb aigua destil·lada, es va agafar una alíquota del suc i es va quantificar els sòlids solubles com a °Brix.
- d) pH. (Microprocessor pH Meter HANNA Instruments pH 210)

## 4.2 Digestió gastrointestinal *in vitro*

Tenint en compte tots els factors mencionats anteriorment, en l'apartat 1.4, i els objectius d'aquest estudi, el mètode escollit per a la digestió *in vitro* és estàtic i inclou tres fases de la digestió; oral, gàstrica i intestinal menor. El mètode està basat en el model descrit per Miller et al., (1981) amb algunes modificacions de Hedrén et al., (2002) i Rodríguez-Roque et al., (2013 i 2015).

- a) Fase oral. Es van mesclar 75g de mostra amb solució salival artificial (SSF) i  $\alpha$ -amilasa (150-200uds/ml). Per simular la mastiació es va passar la mescla pel Stomacher durant 1 minut i es va incubar a 37°C i 95rpm, durant 10 minuts en la foscor (Orbital OVAN).
- b) Fase gàstrica. Per simular les condicions de l'estómac en el procés de digestió es va ajustar la mostra a un pH de 4 amb HCl 5M. Immediatament es va afegir la pepsina (1,8 mg/ml amb una concentració de 40mg/ml de HCl 0,1M) i es va tornar a ajustar el pH a 2. Posteriorment, es va tornar a incubar la mostra durant 2 hores a les mateixes condicions que en la fase oral.
- c) Fase intestinal. Un cop acabada la fase gàstrica, es va reajustar el pH a 5'3 amb NaOH 2M. Es va afegir la pancreatina i les sals biliars dissoltes en bicarbonat de sodi (0,4mg/ml i 2,5mg/ml en una concentració de 4mg/ml i 25mg/ml respectivament de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M) . Immediatament es va reajustar el pH a 7'5. Es va tornar a incubar durant 2 hores a les



mateixes condicions que a la fase oral i gàstrica. Les sals biliars són un element imprescindible ja que són les encarregades de solubilitzar les gotes lipídiques que contenen els carotenoides per poder formar les micelles en la següent fase. Un cop finalitzada la incubació per frenar l'activitat enzimàtica de la mostra es va posar amb gel durant 10 minuts.

- Fracció micel·lar. Per obtenir la porció de carotenoides dissolts en les micelles de la fase aquosa, es va centrifugar la mostra a 15000 rpm durant 20 minuts. La fase aquosa va ser recollida i filtrada dues vegades, la primera amb un filtre Whatman 1 i la segona en un filtre de 1–3 micròmetres. Amb la centrifugació se separa la fase aquosa de la fase sòlida formada per la pell i la polpa, i del sobrenedant format pels lípids no digerits. En la mostra resultant es troben els carotenoides alliberats de la matriu del tomàquet i que són bioaccessibles.

Per controlar els canvis en la concentració de carotenoides, la mostra final es va congelar immediatament a -30°C i posteriorment es va liofilitzar fins a la seva extracció.

#### **4.3 Extracció dels carotenoides**

En el procés d'extracció, es poden diferenciar dues fases; filtrat i rentat. La primera per separar, mitjançant la homogeneïtzació, els residus sòlids del extracte. La segona per separar els carotenoides d'altres substàncies que puguin estar presents en la fase orgànica.

Donat que, els carotenoides són substàncies fàcilment degradables, es necessari cobrir els envasos que contenen la mostra amb paper d'alumini per evitar l'efecte de la llum i utilitzar material de vidre ambaritzat que bloquegi i el pas de la llum. A més, és important treballar el més ràpid possible i amb fred, utilitzar gel per recobrir els envasos si s'escau, per evitar la degradació per l'acció de la calor.

A partir de 1g de mostra liofilitzada es va afegir carbonat de magnesi (0,01g) i BHT (0,01g) per a preservar la mostra i evitar l'oxidació. Es va mesclar amb 15ml de solució de etanol:hexà (4:3) en un tub *Falcon*, perquè es considerat el millor dissolvent per als carotenoides (Lin & Chen, 2003). Tota la mescla es va homogeneïtzar durant 2 minuts i per evitar l'efecte de la calor sobre la mostra es va cobrir l'envàs amb gel. Posteriorment, es va realitzar el primer filtrat utilitzant un paper de filtre i amb el residu es va repetir el mateix procés explicat anteriorment però amb 10ml d'etanol:hexà (4:3). Per evitar al mínim les pèrdues es van fer dos rentats del residu romanent al tub *Falcon* amb etanol (5ml) i un amb hexà (5ml). Per cada rentat es va filtrar al buit i finalment es va recollir en un embut de decantació.

La mostra obtinguda després del filtrat es va rentar tres vegades amb 10ml de NaCl al 10%, i dos amb aigua destil·lada descartant la fase aquosa cada vegada. Aquest procés serveix per separar els carotenoides purs i eliminar qualsevol residu que pugui haver, per exemple les clorofil·les. Després de l'últim rentat amb aigua destil·lada es va recollir la fase orgànica on es troben els carotenoides. Finalment, es va filtrar amb paper de filtre i enrasar amb hexà fins a 5ml.

## 4.4 Determinacions

Com ja s'ha mencionat anteriorment, gràcies al cromòfor els carotenoides tenen la capacitat d'absorbir la llum i proporcionar l'espectre d'absorció visible que serveix com una base per a la seva identificació i quantificació a través del espectrofotòmetre. El color que proporcionen és un instrument de control de les diferents etapes en l'anàlisi dels carotenoides, ja que la pèrdua o alteració del color en qualsevol punt de l'anàlisi és un indicador de degradació o canvis estructurals. Per realitzar les determinacions corresponents és necessari partir d'una mostra d'extracció líquida.

### 4.4.1 Licopè

L'absorbància màxima del licopè és a 470nm, però pot haver-hi interferències amb altres compostos presents en el tomàquet com és el cas del  $\beta$ -carotè. Per determinar el seu contingut es va mesurar l'absorbància a 503nm per minimitzar aquestes interferències. Per quantificar el licopè de la mostra es va utilitzar la següent fórmula (Fish et al., 2002):

$$\text{Licopè} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Abs}_{503} \times \text{PM} \times V}{\epsilon \times L \times \text{Pm (kg)} \times 100}$$

on;

PM: pes molecular del licopè (536,9g/mol).

V: volum d'hexà en ml que dependrà del factor de dilució.

$\epsilon$ : factor d'extinció (172000 L/mol x cm).

L: longitud de pas de la cubeta (1cm).

Pm: pes de la mostra inicial.

La determinació del licopè és en pes sec, ja que la liofilització va eliminar tota l'aigua que podia haver en el tomàquet. Per expressar els valors en grams de pes fresc (g PF) es va utilitzar la següent fórmula:

$$\text{Pes fresc} = \text{Pes en sec} \times (100 - \% \text{ humitat})$$

on;

El % d'humitat es va calcular a partir dels pesos de les mostres D abans de digerir i després de liofilitzar, de la següent manera:

$$\% \text{ Humitat} = 100 - \frac{\text{Pes en sec}}{\text{Pes fresc}} \times 100$$

#### 4.4.2 Carotenoides totals

Per a la determinació dels carotenoides totals (CT) del tomàquet es va mesurar l'absorbància a 470nm, utilitzant el hexà com el blanc.

El contingut en CT es va calcular a partir de la formula següent (Gross, 1991):

$$\text{CT} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Abs}_{470} \times V \times 10^4}{A^{1\%} \times P_m}$$

on;

V: volum final del extracte, dependrà del factor de dilució aplicat.

A<sup>1%</sup>: absorbància específica d'una solució al 1% mesurada en una cubeta d'1cm, 2500 (Talcott & Howard, 1999). Aquest valor s'utilitza quan el coeficient específic d'absorbància es desconeix o generalment, per a la determinació de carotenoides totals (Gross, 1991).

P<sub>m</sub>: pes de la mostra inicialment.

Els valors obtinguts en aquesta determinació també es van expressar en g PF.

#### 4.4.3 Capacitat antioxidant lipofílica

La capacitat antioxidant d'un aliment depèn de la naturalesa i concentració dels antioxidants presents en aquest. Existeixen diferents tècniques per determinar-la basades en comprovar el dany oxidatiu d'un agent oxidant sobre un substrat, els carotenoides. Aquest dany és inhibit o reduït en presència d'antioxidants, i el percentatge d'inhibició és proporcional a la capacitat antioxidant de la mostra. Els diferents mètodes difereixen en l'agent oxidant utilitzat, el substrat, el temps d'avaluació, la tècnica instrumental utilitzada i les possibles interaccions en el medi de reacció.

Un mètode senzill i exacte per determinar la capacitat antioxidant d'extractes vegetals és el mètode DPPH, que avalua la capacitat que té un possible antioxidant per captar un radical lliure cedint els seus electrons (Mahattanatawee, 2006). El mètode DPPH, descrit per Brand-Williams et al., (1995) es basa en el compost 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), un radical lliure que s'absorbeix a una longitud d'ona de 515nm de manera que es pot determinar per tècniques espectroscòpiques i posseeix un color característic de tonalitat violeta intens. El mètode es basa en l'oxidació de l'espècie antioxidant que cedeix un electró. Per contra, el radical es redueix perquè rep l'electró de l'antioxidant. D'aquesta manera la reducció del DPPH provoca la pèrdua de color que es determina per espectrofotometria.

En el estudi, per mesurar la capacitat antioxidant lipofílica (LAC) dels carotenoides del tomàquet es va mesclar 10µl d'extracte i 90µl d'aigua destil·lada amb 3'9ml de solució DPPH amb metanol, es va agitar i deixar reposar durant 30 minuts en la foscor a partir de la primera mostra que es va mesclar. Per cada extracte es van obtenir 5 repeticions. Es va mesurar al espectrofotòmetre a 515nm amb un blanc de metanol, ja que la solució del DPPH es prepara amb metanol (0.025g/L segons Vallverdú-Queralt et al., (2012)). Amb l'absorbància que obtinguda es va calcular el percentatge d'inhibició del DPPH sobre l'oxidació lipídica, a partir de la següent formula (Robles-Sánchez et al., 2009):

$$\% \text{ Inhibició DPPH} = \frac{\text{Cabs} \times \text{Mabs}}{\text{Mabs}} \times 100$$

on;

Cabs: concentració inicial de radical DPPH amb aigua destil·lada.

Mabs: concentració de DPPH que s'ha reduït.

Els valors d'inhibició del DPPH es van calcular mitjançant una equació de regressió entre la concentració de Trolox equivalents (TEAC) i el percentatge d'inhibició del DPPH. Els resultats van ser expressats en µmols TEAC / 100g PF de tomàquet.

#### 4.5 Bioaccessibilitat

La bioaccessibilitat va ser determinada a través de la següent fórmula (Rodríguez-Roque et al., 2015).

$$\% \text{ Bioaccessibilitat} = \frac{C_D}{C_{ND}} \times 100$$

on;

$C_D$ : concentració total en mostra digerida.

$C_{ND}$ : la concentració total en mostra no digerida.

La fracció bioaccessible es va expressar en relació al contingut inicial de la mostra i en tant per cent.

#### 4.6 Anàlisi estadístic

Es van realitzar les digestions i extraccions per duplicat. Els resultats es van expressar com a valor mig  $\pm$  desviació estàndard. L'anàlisi de variància (ANOVA) es va portar a terme per determinar diferències significatives en els resultats obtinguts al llarg de l'estudi mitjançant el programa STATGRAPHIC Plus 5.1.

## 5. Resultats i discussió

Com s'ha mencionat anteriorment, en l'apartat de Metodologia, tant la determinació de licopè, com la de carotenoides totals i capacitat antioxidant lipofílica es va dur a terme a través de tècniques espectrofotomètriques.

### 5.1 Caracterització del tomàquet

Com s'observa en la taula següent els tomàquets en estat 1 eren totalment verds ( $a^* = -14,3 \pm 1,0$ ) amb traces gairebé imperceptibles de tonalitat groga que a simple vista es mesclaven amb el verd, color propi de fruit que encara no és madur. A mesura que avançava la maduració del tomàquet la tonalitat verda desapareixia atès que la clorofil·la es degrada, i apareix el color propi del tomàquet, el color vermell ( $a^* = 16,0 \pm 2,3$ ), degut a la biosíntesi dels pigments carotenoides. La lluminositat ( $L^*$ ) va disminuir durant la maduració. El desenvolupament del color està controlat per enzims dependents del etilè, hormona reguladora de la síntesi de carotenoides i degradació de la clorofil·la (Grierson, 1986).

**Taula 4. Paràmetres de caracterització del tomàquet durant la seva maduració.** Cada valor és el valor mig de vuit repeticions  $\pm$  desviació estàndard. El color es va determinar per tres paràmetres;  $L^*$  balanç entre blanc ( $L=0$ ) i negre ( $L=100$ ).  $a^*$  variacions entre color verd (valors negatius) i vermell (valors positius).  $b^*$  variacions entre el color blau (valors negatius) i groc (valor positiu).

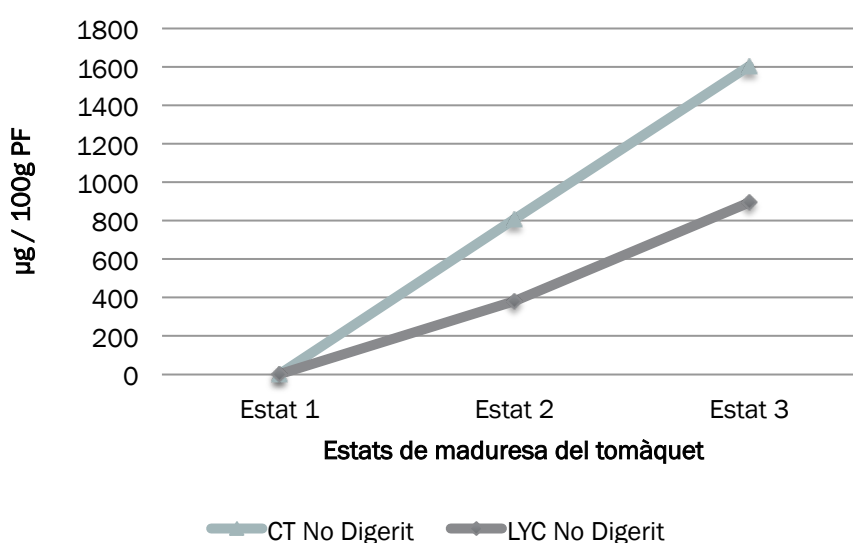
Estat	Color			SST (°Brix)	AT	pH
	$L^*$	$a^*$	$b^*$			
1	46 $\pm$ 3	-14,3 $\pm$ 1,0	25,2 $\pm$ 1,8	5	0,2	4,2
2	45,9 $\pm$ 1,8	0 $\pm$ 4	25 $\pm$ 2	5	0,4	4,0
3	44,8 $\pm$ 0,8	16,0 $\pm$ 2,3	24 $\pm$ 3	5,1	0,4	4,1

L'àcida total (AT) i la quantitat de sòlids solubles totals (SST) són paràmetres que formen part de la qualitat del tomàquet. Es van mantenir constants, no es va observar efecte del grau de maduresa. Donat que els tomàquets van ser collits en estat verd la quantitat de SST no acostuma a assolir valors típics del fruit madur (Casierra-Posada i Aguilar-Avendaño, 2008). El grau de maduresa tampoc va mostrar efecte sobre el pH del tomàquet ja que es va mantenir a 4.

## 5.2 Efecte del grau de maduresa del fruit sobre la bioaccessibilitat del licopè i carotenoides totals del tomàquet

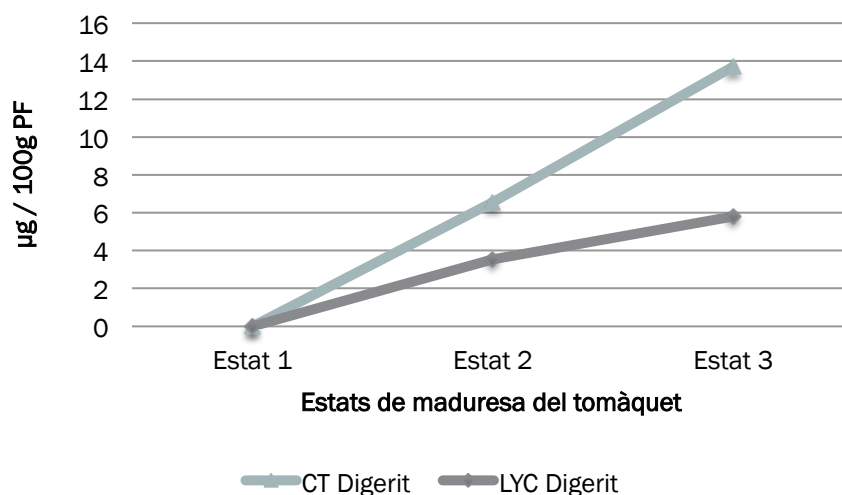
En referència al contingut inicial de carotenoides totals i licopè, aquests van experimentar un increment important durant la maduració. Els resultats mostren com la síntesi de carotenoides augmentava progressivament a mesura que el fruit madurava. López-Vidal et al., (2015) també van observar resultats similars després de caracteritzar diferents varietats de tomàquet.

En les següents gràfiques (Figures 2 i 3) s'observen dos fets a destacar; un augment, tant en el contingut inicial com en el de després de la digestió *in vitro*, de carotenoides totals i licopè a mesura que el fruit madura, així com les importants pèrdues que comporta la digestió. En el cas del estat 1, absorbàncies molt baixes no van ser detectables per l'espectrofotòmetre, altres autors com Cano et al., (2013) ja van observar resultats similars.



**Figura 2** Contingut inicial de licopè i carotenoides totals en mostres de tomàquet tallat a daus no digerides.





**Figura 3. Contingut inicial de licopè i carotenoides totals en mostres de tomàquet tallat a daus i sotmeses a la digestió in vitro.**

Pel que fa als carotenoides totals i licopè, es va observar un increment significatiu de la seva bioaccessibilitat durant la maduració (veure Annex – Taules 1 i 3). Els valors més alts de bioaccessibilitat es van observar en l'estat completament madur (5,04% en l'oli d'oliva).

Com s'ha mencionat anteriorment, el procés de maduració del fruit implica una sèrie de canvis que principalment provoquen la degradació de la clorofil·la i la biosíntesi i emmagatzematge dels carotenoides o carotenogènesi. Aquest fet es tradueix en la pèrdua del color verd i l'aparició del color del fruit (Rodríguez-Amaya, 1997). La carotenogènesi esta determinada per diferents factors com la presència d'oxigen en el ambient, la exposició a la llum i la temperatura (Sánchez et al., 1999; Abushita et al., 2000). Rodríguez-Amaya (1997), mostra com el contingut total en carotenoides pot variar segons altres factors com l'exposició a la llum i la temperatura. En el present estudi, els tomàquets es van emmagatzemar a la foscor i a una temperatura de  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ , atès que no es pretenia estudiar la influència d'aquests factors sobre la maduració.

### **5.3 Influència de l'addició i tipus de lípids en la bioaccessibilitat dels carotenoides del tomàquet**

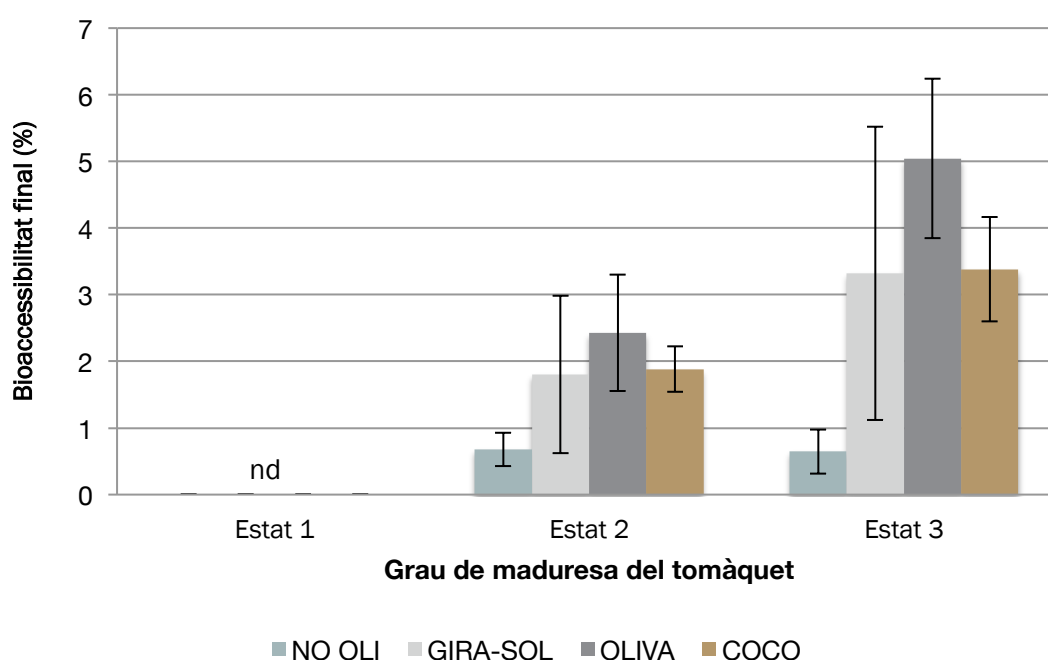
La formació de micelles depèn, entre altres factors, de la presència de lípids en l'intestí. Conseqüentment la co-ingesta de lípids i aliments rics en carotenoides sembla ser un factor determinant en la bioaccessibilitat (Brown et al., 2004; Ahuja et al., 2006; Alminger et al., 2014).

#### **5.3.1 Carotenoides totals**

Els valors de bioaccessibilitat de les mostres de tomàquet amb addició de diferents tipus d'oli van ser significativament superiors a les de les mostres sense oli, destacant l'efectivitat de l'oli d'oliva en ambdós estats (veure Annex – Taules 1 i 2). Aquest fet podria estar relacionat amb que els carotenoides al ser substàncies lipofíliques tendeixen a associar-se amb la matèria grassa del aliment. Per tant l'addició d'oli, independentment del tipus, va afavorir l'alliberament dels carotenoides de la matriu del tomàquet i la solubilització d'aquests en les micelles (Figura 4). Diversos autors han investigat sobre la presència d'oli en aliments i l'efecte que tenen sobre la bioaccessibilitat dels carotenoides. En general, sembla ser que aquest factor és més efectiu en els carotens, com el licopè, que en les xantofil·les. Aquest fet s'atribueix a les diferències de polaritat entre els dos grups de carotenoides (Lemmens et al., 2014).

En quant al tipus d'oli addicionat, els olis utilitzats eren clarament diferents en quant a composició (Taula 4), però malgrat haver-hi diferències en el percentatge de bioaccessibilitat no van ser estadísticament significatives (veure Annex – Taula 2). Per tant, no es va poder concloure quin tipus d'oli va tenir més influència sobre la bioaccessibilitat dels carotenoides totals del tomàquet. Diferents autors han considerat tant el grau d'insaturació i la longitud de la cadena dels àcids grassos com a factors determinants de la bioaccessibilitat, Huo et al., (2007) va observar un increment en la formació de micelles a mesura que augmentava la longitud de la cadena dels àcids grassos, a través de la digestió d'una amanida amb diferents tipus d'oli, però no va observar diferències significatives en quant

al grau d'insaturació. Lemmens et al., (2014) parla de la capacitat de les micelles per inflar-se (“*micellar swelling capacity*”) en la fase de solubilització de les petites gotes lipídiques que contenen els carotenoides, refereix que la hidròlisi d'àcids grassos de cadena llarga dóna lloc a micelles més inflades que la hidròlisi d'àcids grassos de cadena mitja, i consegüentment a valors més alts de bioaccessibilitat. Altres autors (Nagao et al., 2013) centrats en investigar el grau d'insaturació, van observar que l'addició d'àcids grassos monoinsaturats era més efectiva que la de poliinsaturats, però no es van considerar resultats concloents atès que s'haurien de confirmar amb estudis *in vivo*.

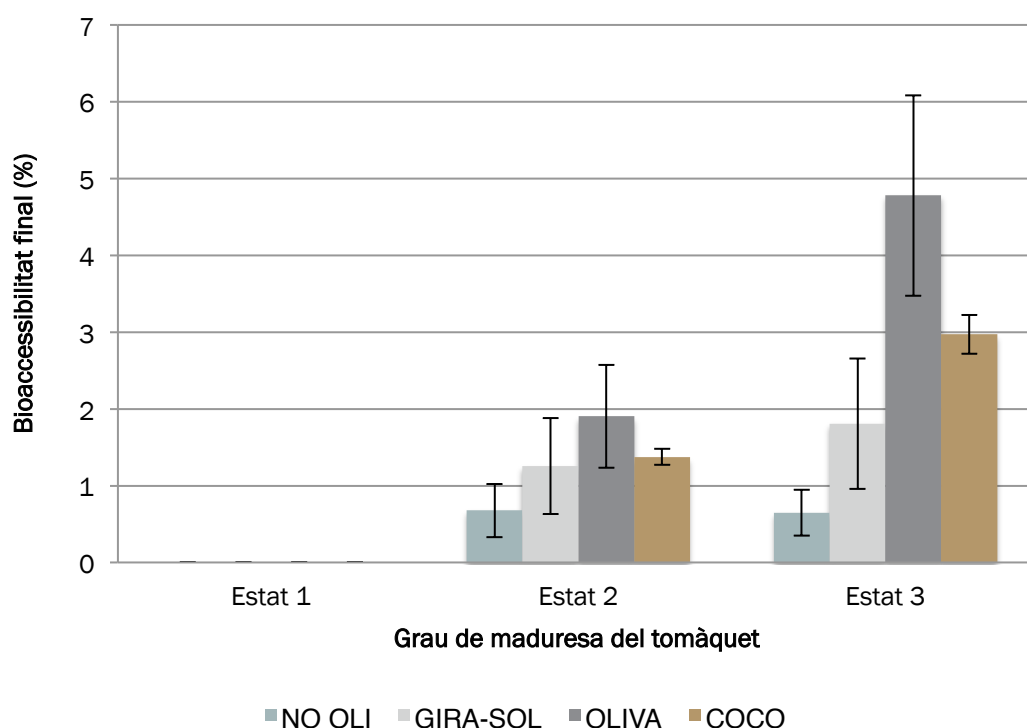


**Figura 4. Bioaccessibilitat de carotenoides totals en trossos de tomàquet de diferent estat de maduresa i amb l'addició d'olis de diferent grau d'insaturació.** En l'estat 1, tomàquet verd-madur, els valors d'absorbància es situaven per sota dels límits de detecció del espectre, per aquest motiu no van ser detectables (nd).

### 5.3.2 Licopè

Els valors de bioaccessibilitat de licopè de les mostres sense oli no va arribar al 1% (0,8 i 0,6% en l'estat 2 i 3 respectivament), en canvi en les mostres que contenien oli la bioaccessibilitat va ser significativament superior. A excepció de les mostres amb oli de gira-sol (veure Annex – Taules 3 i 4). Diversos estudis científics *in vivo* han demostrat la ingesta de licopè i oli és un factor que influeix en la seva biodisponibilitat. Brown et al., (2004) van demostrar que la quantitat de licopè en plasma en humans era major quan ingerien una amanida rica en

carotenoides i lípids enfront d'una amb baix contingut en lípids. Seguint la mateixa línia, Fielding et al., (2005) també van observar un augment en la concentració de licopè en el grup que havia ingerit tomàquets cuinats amb oli d'oliva, en comparació als tomàquets cuinats sense oli.



**Figura 9. Bioaccessibilitat del licopè en trossos de tomàquet de diferent estat de maduresa i amb l'addició d'olis de diferent grau d'insaturació.** En l'estat 1, tomàquet verd-madur, els valors d'absorbància es situaven per sota dels límits de detecció del espectre, per aquest motiu no van ser detectables (Nd).

És important remarcar que la quantitat d'oli afegida a les mostres esta basada en investigacions prèvies que demostren que una addició d'oli d'oliva superior a 5% durant la digestió no dona lloc a un increment en la bioaccessibilitat dels carotenoides (Colle et al., 2012), aquest fet es podria atribuir a una incompleta hidròlisi dels triglicèrids (Porter et al., 2004). Contràriament, Huo et al., (2007) van observar que la presència d'oli en els aliments havia d'estar entre 0,5 i 1% per afavorir la solubilització total dels carotenoides en les micelles ja que, elevades quantitats de triglicèrids de cadena llarga (oli d'oliva, oli de gira-sol i oli de peix) disminuïen significativament la bioaccessibilitat del licopè.

En quant a la influència del tipus de lípid addicionat sobre la bioaccessibilitat del licopè, l'oli d'oliva va ser el tipus que valors més elevats va mostrar en ambdós

estats de maduresa (1,9 i 4,8%), seguit de l'oli de coco (1,4 i 3,0%). Mostrant diferències significatives en els resultats. En canvi l'efecte de l'oli de gira-sol sobre la bioaccessibilitat malgrat mostrar un increment (1,3 i 1,8%), els resultats no van ser estadísticament significatius (Veure Annex – Taula 4). Contràriament, Colle et al., (2012) va observar que, en les mateixes quantitats d'oli d'oliva i de gira-sol, la bioaccessibilitat del licopè no va ser significativament diferent entre diferents tipus d'oli. A més a més, va proposar que la incorporació del licopè a les micelles no esta influenciada pel grau d'insaturació dels lípids, tal i com va mostrar prèviament Huo et al., (2007) en el seu estudi.

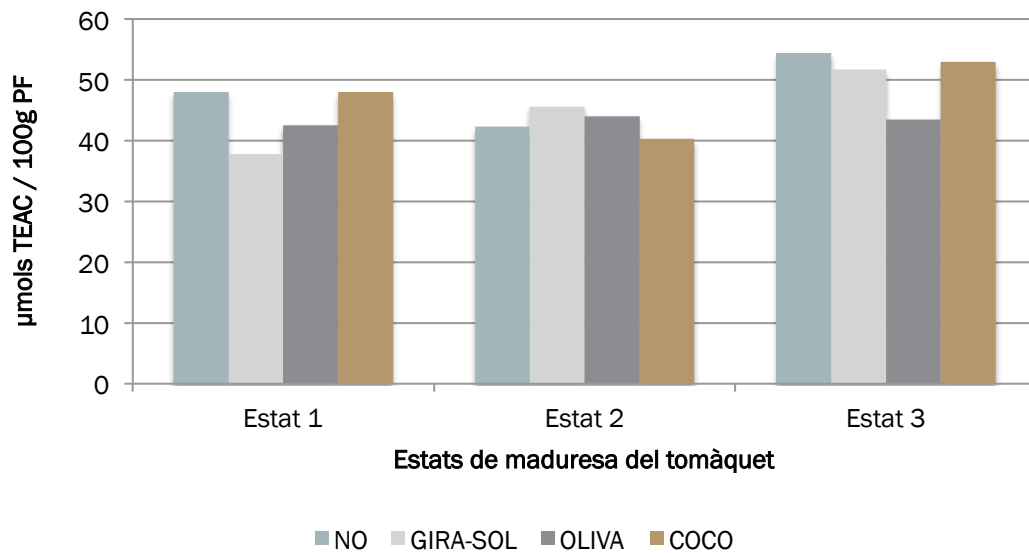
#### **5.4 Capacitat antioxidant lipofílica del tomàquet.**

La capacitat antioxidant lipofílica és un paràmetre que determina el valor nutricional d'un fruit com aliment funcional. El que s'avalua és la capacitat que tenen els antioxidants, en aquest cas del tomàquet, per captar els radicals lliures i disminuir l'estrès oxidatiu (Zanfini et al., 2010; López-Vidal et al., 2014). La capacitat antioxidant d'un fruit dependrà de la composició i concentració dels seus antioxidants (Rodríguez-Roque et al., 2013).

Els valors més alts d'activitat antioxidant es van observar quan el tomàquet estava completament madur (estat 3). Aquest fet es podria relacionar amb els continguts en licopè i carotenoides totals mostrats anteriorment (Figures 2 i 3). En canvi entre els estats 1 i 2 no va haver diferències significatives en la capacitat antioxidant (veure Annex – Taula 5 i 6). Cal mencionar que el tomàquet en la seva composició conté altres tipus de molècules antioxidants lipofíliques que no són carotenoides, com la vitamina E, que també contribueixen en la capacitat antioxidant lipofílica del tomàquet (Vallverdú-Queralt, 2012). López-Vidal et al., (2014) i Liu et al., (2012) també van observar una correlació entre la capacitat antioxidant lipofílica del tomàquet i els nivells de licopè durant la seva maduració. Per tant, el grau de maduresa és un factor que influeix positivament en la capacitat antioxidant del tomàquet. És important mencionar que existeixen pocs estudis sobre canvis en la capacitat antioxidant i maduració d'un fruit.

En l'anàlisi de variància s'observa que la presència d'oli no va tenir efecte sobre la capacitat antioxidant del tomàquet. Tot i que els olis aporten cert valor

antioxidant la quantitat afegida era molt baixa com per tenir una repercussió important sobre l'activitat antioxidant (veure Annex – Taules 5 i 7). A més, el tomàquet per si sol és considerat un fruit amb una capacitat antioxidant remarcable.



**Figura 5. Capacitat antioxidant lipofílica de trossos de tomàquet.**

## 6. Conclusions

El tomàquet es considera un fruit amb alt poder antioxidant degut principalment al seu contingut en carotenoides, en general, i en licopè, en particular. La determinació de la bioaccessibilitat de diferents compostos fitoquímics, com els carotenoides, mitjançant sistemes de digestió *in vitro* és un procés relativament senzill i econòmic que permet simular el procés de digestió humana i entendre una mica més la seva complexitat. Malgrat tot, els resultats *in vitro* sempre seran una aproximació dels estudis en humans, atès que no es poden controlar tots els factors que influencien. D'altra banda, el procés de digestió repercuteix negativament en el contingut de carotenoides i licopè reduint la seva concentració inicial a nivells molt baixos un cop s'ha digerit l'aliment.

El contingut en licopè i carotenoides totals és proporcional al grau de maduresa, i aquest condiona la bioaccessibilitat d'aquests compostos. A mesura que augmenta el seu contingut s'incrementa la fracció bioaccessible. La presència de lípids en el tomàquet tallat a daus augmenta la bioaccessibilitat del licopè i dels carotenoides totals. En canvi, l'addició dels diferents tipus de lípids amb diferent grau d'insaturació no dona lloc a diferències estadísticament significatives en els valors de bioaccessibilitat. Malgrat tot, l'addició d'oli d'oliva ha produït els increments més remarcables de la bioaccessibilitat d'aquests compostos. El grau de maduresa del fruit va estretament lligat al contingut en carotenoides i licopè del tomàquet, així com a la seva capacitat antioxidant lipofílica. No obstant, l'addició d'oli no mostra cap influència en la capacitat antioxidant del tomàquet.

Per últim, els resultats obtinguts s'haurien de comparar amb estudis *in vivo* que mostrarien la bioaccessibilitat real d'aquestes compostos amb la influència dels d'altres factors que en mètodes *in vitro* no es poden controlar.

## 7. Bibliografía

- Abushita, A.A., Daoood, H.G. and Biacs, P.A. 2000. "Change in Carotenoids and Antioxidant Vitamins in Tomato as a Function of Varietal and Technological Factors". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2075–2081.
- Ahuja, K. D K, Jane K. Pittaway, and Madeleine J. Ball. 2006. "Effects of Olive Oil and Tomato Lycopene Combination on Serum Lycopene, Lipid Profile, and Lipid Oxidation." *Nutrition* 22(3): 259–65.
- Anese, Monica, Giorgio Mirolo, Paola Beraldo, and Giovanna Lippe. 2013. "Effect of Ultrasound Treatments of Tomato Pulp on Microstructure and Lycopene in Vitro Bioaccessibility." *Food Chemistry* 136(2): 458–63.
- Arranz, Sara et al. 2015. "Influence of Olive Oil on Carotenoid Absorption from Tomato Juice and Effects on Postprandial Lipemia." *Food chemistry* 168: 203–10.
- Bouayed, Jaouad, Lucien Hoffmann, and Torsten Bohn. 2011. "Total Phenolics, Flavonoids, Anthocyanins and Antioxidant Activity Following Simulated Gastro-Intestinal Digestion and Dialysis of Apple Varieties: Bioaccessibility and Potential Uptake." *Food Chemistry* 128(1): 14–21.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity." *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25–30.
- Bravo Lozar, Sergio. 2012. "Optimización Del Contenido Y Disponibilidad Del Licopeno Y Otros Compuestos Bioactivos En Tomate Y Productos Elaborados Con Tomate." Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria.
- Brown, Melody J. et al. 2004. "Carotenoid Bioavailability Is Higher from Salads Ingested with Full-Fat than with Fat-Reduced Salad Dressings as Measured with Electrochemical Detection." *American Journal of Clinical Nutrition* 80(2): 396–403.
- Cano, Antonio, Manuel Acosta, and Marino B. Arnao. 2003. "Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Activity Changes during on-Vine Ripening of Tomatoes (*Lycopersicon Esculentum* Mill.)." *Postharvest Biology and Technology* 28(1): 59–65.
- Carbonell-Capella, Juana M. et al. 2014. "Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(2): 155–71.
- Casierra-Posada, Fánor, and Óscar E Aguilar-Avedaño. 2008. "Quality of Tomato Fruits (*Solanum Lycopersicum*) Harvested at Different Maturity Stages." *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 26(2): 300–307.



- Coles, L. T., Moughan, P. J., and Darragh, A. J. 2005. "In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals." *Animal Food Science and Technology*, 123–124, 421–444.
- Colle, Ines J.P. et al. 2012. "The Type and Quantity of Lipids Present during Digestion Influence the in Vitro Bioaccessibility of Lycopene from Raw Tomato Pulp." *Food Research International* 45(1): 250–55.
- Colle, Ines et al., 2013. "Processing Tomato Pulp in the Presence of Lipids: The Impact on Lycopene Bioaccessibility." *Food Research International* 51(1): 32–38.
- Dumas, Yvon, Mario Dadomo, Giuseppe Di Lucca, and Pascal Grolier. 2003. "Effects of Environmental Factors and Agricultural Techniques on Antioxidant Content of Tomatoes." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(5): 369–82.
- Estruch, R et al. 2013. "Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet." *Nejm* 368(14): 1279.
- F.F. Benzie, Iris, and Sissi Wachtel-Galor. 2013. "Bioavailability of Antioxidant Compounds from Fruits." In *Bioactives in Fruit. Health Benefits and Functional Foods.*, eds. Margot Skinner and Denise Hunter. , 35–58.
- Faulks, Richard Martin, and Susan Southon. 2005. "Challenges to Understanding and Measuring Carotenoid Bioavailability." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1740(2): 95–100.
- Fielding, J.M, K.G Rowley, P Cooper, and K O'Dea. 2005. "Increases in Plasma Lycopene Concentration after Consumption of Tomatoes Cooked with Olive Oil." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 14(2): 131–36.
- Fish, Wayne W., Penelope Perkins-Veazie, and Julie K. Collins. 2002. "A Quantitative Assay for Lycopene That Utilizes Reduced Volumes of Organic Solvents." *Journal of Food Composition and Analysis* 15(3): 309–17.
- Foote, C S, Y C Chang, and R W Denny. 1970. "Chemistry of Singlet Oxygen. X. Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection." *Journal of the American Chemical Society* 92(17): 5216–18.
- Furr, H C, and R M Clark. 1997. "Intestinal Absorption and Tissue Distribution of Carotenoids\* 1." *The Journal of nutritional biochemistry* 8(7): 364–77.
- García-Valverde, Verónica, Inmaculada Navarro-González, Javier García-Alonso, and María Jesús Periago. 2013. "Antioxidant Bioactive Compounds in Selected Industrial Processing and Fresh Consumption Tomato Cultivars." *Food and Bioprocess Technology* 6(2): 391–402.

- Garrett, Dean a., Mark L. Failla, and Robert J. Sarama. 2000. "Estimation of Carotenoid Bioavailability from Fresh Stir-Fried Vegetables Using an in Vitro digestion/Caco-2 Cell Culture Model." *Journal of Nutritional Biochemistry* 11(11-12): 574–80.
- Granado-Lorencio, Fernando et al. 2007. "In Vitro Bioaccessibility of Carotenoids and Tocopherols from Fruits and Vegetables." *Food Chemistry* 102(3): 641–48.
- Grierson D and Kader AA. 1986. "Fruit ripening and quality; physiology and biochemistry of ripening, in *The Tomato Crop, a Scientific Basis for Improvement*", Ed by Atherton JG and Rudich J. Chapman and Hall Ltd. 241–259
- Gross, J. 1987. "Carotenoids." In *Pigments in Fruits*; B.S. Schweigert p115–185.
- Gross, J. 1991. "Carotenoids." In *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*; Van Nostrand Reinhold. p100.
- Hedrén, Ellen, Generose Mulokozi, and Ulf Svanberg. 2002. "In Vitro Accessibility of Carotenes from Green Leafy Vegetables Cooked with Sunflower Oil or Red Palm Oil." *International journal of food sciences and nutrition* 53(6): 445–53.
- Huo, Tianyao, Mario G Ferruzzi, Steven J Schwartz, and Mark L Failla. 2007. "Impact of Fatty Acyl Composition and Quantity of Triglycerides on Bioaccessibility of Dietary Carotenoids." : 8950–57.
- Hur, Sun Jin, Beong Ou Lim, Eric a. Decker, and D. Julian McClements. 2011. "In Vitro Human Digestion Models for Food Applications." *Food Chemistry* 125: 1–12.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. 2001. "Plagas y enfermedades del tomate". Madrid, Mundi Prensa.
- Lemmens, Lien et al. 2014. "Carotenoid Bioaccessibility in Fruit- and Vegetable-Based Food Products as Affected by Product (micro)structural Characteristics and the Presence of Lipids: A Review." *Trends in Food Science and Technology* 38(2): 125–35.
- Lin, C. H., and Chen, B. H. 2003. "Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1012, 103–109.
- Liu, C., M.M. Jahangir and T. Ying 2012. "Alleviation of chilling injury in postharvest tomato fruit by preconditioning with ultra-violet irradiation." *Journal Science Food Agriculture* 92: 3016-3022.
- López Vidal, O, H Escalona Buendía, C Pelayo Zaldívar, and J Cruz Salazar. 2014. "Carotenoid Content, Antioxidant Capacity and Volatile Compounds of the Aroma during Tomato Ripening." 9457: 185–92.

- Lugasi, A., Biró, L., Hóvárie, J., Sági., K.V., Brand, S. and Barna, E. 2003. "Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population." *Nutrition Research*, 23:1035-1044.
- Mahattanatawee, Kanjana et al. 2006. "Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(19): 7355–63.
- Martínez-Roldan, Cristina, and Ángeles Carbajal Azcona. 2012. "Compuestos Bioactivos de Los Alimentos."
- Martínez-Huélamo, Miriam et al. 2014. "The Tomato Sauce Making Process Affects the Bioaccessibility and Bioavailability of Tomato Phenolics: A Pharmacokinetic Study." 173: 864–72.
- Martínez-Valverde, Isabel, María J. Periago, Gordon Provan, and Andrew Chesson. 2002. "Phenolic Compounds, Lycopene and Antioxidant Activity in Commercial Varieties of Tomato (*Lycopersicum Esculentum*)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(3): 323–30.
- Miller, D.D., Schricker, B.R., Rasmussen, R.R., and Van Campen, D. 1981. "An in vitro method for estimation of iron availability from meals". *American Journal of Clinical Nutrition* 34:2248–2256
- Mínguez-Mosquera, María Isabel, Antonio Pérez Gálvez, and Dámaso Hornero Méndez. 2005. "Pigmentos Carotenoides En Frutas Y Vegetales ; Mucho Más Que Simples ' Colorantes ' Naturales." : 2–7.
- Nagao, Akihiko, Eiichi Kotake-Nara, and Megumi Hase. 2013. "Effects of Fats and Oils on the Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E in Vegetables." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77(5): 1055–60.
- Olmedilla, Begoña, Fernando Granado, and Inmaculada Blanco. 2001. *Carotenoides Y Salud Humana*.
- Parada, J., and J. M. Aguilera. 2007. "Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients." *Journal of Food Science* 72(2).
- Periago, María J et al. 2009. "Bioactive Compounds, Folate and Antioxidant Properties of Tomatoes (*Lycopersicum Esculentum*) during Vine Ripening." *International journal of food sciences and nutrition* 60(8): 694–708.
- Pingitore, a. et al. 2015. "Exercise and Oxidative Stress: Potential Effects of Antioxidant Dietary Strategies in Sports." *Nutrition* 31(7-8): 916–22.
- Porter, C. J. H., et al. 2004. "Use of in vitro lipid digestion data to explain the in vivo performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: studies with halofantrine" *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 1110-1121.

- Richelle, Myriam et al. 2002. "A Food-Based Formulation Provides Lycopene with the Same Bioavailability to Humans as That from Tomato Paste." *The Journal of nutrition* 132(3): 404–8.
- Robles-Sánchez, Rosario M. et al. 2009. "Effect of Minimal Processing on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fresh-Cut 'Kent' Mango (*Mangifera Indica* L.)." *Postharvest Biology and Technology* 51(3): 384–90.
- Rodriguez-Amaya, Delia B. 1997. "Carotenoides Y Preparación de Alimentos: La Retención de Los Carotenoides Provitamina A En Alimentos Preparados, Procesados Y Almacenados."
- Rodriguez-Amaya, Delia B. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*.
- Rodríguez-Roque, María Janeth, María Alejandra Rojas-Graü, Pedro Elez-Martínez, and Olga Martín-Belloso. 2013. "Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(8): 1859–67.
- Rodríguez-Roque, María Janeth et al. 2015. "Impact of Food Matrix and Processing on the in Vitro Bioaccessibility of Vitamin C, Phenolic Compounds, and Hydrophilic Antioxidant Activity from Fruit Juice-Based Beverages." *Journal of Functional Foods* 14: 33–43.
- Sánchez, A, et al. 1999. "Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación Y Aplicaciones." *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41: 175–91.
- Segura, Ramon. 2014. "Free Radicals. Their Effects on Biomolecular Structures and Human Health." *Tecnología i Ciència dels Aliments* 14(1): 3–33.
- Sun-Waterhouse, Dongxiao. 2013. "Stability and Bioaccessibility of Bioactives in Foods: Food Component Interactions and Matrix Effect." In *Bioactives in Fruit. Health Benefits and Functional Foods*., eds. Margot Skinner and Denise Hunter. , 467–99.
- Talcott, S. T., and L. R. Howard. 1999. "Phenolic Autoxidation Is Responsible for Color Degradation in Processed Carrot Puree." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(5): 2109–15.
- Vallverdú i Queralt, Anna. 2012. "Influència de L'origen I Del Processat En El Nivell de Polifenols I Antioxidants Del Tomàquet I Dels Seus Derivats." Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia.
- Yahia, Elhadi M., and José de Jesús Ornelas-Paz. 2009. "Chemistry, Stability and Biological Actions of Carotenoids." In *Fruit and Vegetable Phytochemicals. Chemistry, Nutritional Value and Stability*., eds. Laura A. de la Rosa, Emilio Alvarez-Parrilla, and Gustavo A. González-Aguilar. , 177–223.

- Zambrano, Judith, J Moyeja, and L Pachecho. 1995. "Efecto Del Estado de Madurez En La Composición Y Calidad de Frutos de Tomate." *Agronomia Tropical* 46(1): 61–72.
- Zanfini, A., G. Corbini, C. La Rosa and E. Dreassi. 2010. "Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between ca- rotenoids and á-tocopherol in synthetic mixtures". *Lebensmittel- Wissenschaft Technologie - Food Science and Technology* 43: 67–72.

# Annex

---

**Taula 1. Analysis of Variance for Carotenoid Bioaccessibility - Type III Sums of Squares.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<i>MAIN EFFECTS</i>					
A: Maduresa	19,1036	1	19,1036	8,77	0,0057
B: Oli	43,6892	3	14,2297	6,53	0,0014
<i>INTERACTIONS</i>					
AB	9,51833	3	3,17278	1,46	0,2451
RESIDUAL	69,7414	32	2,17942		
TOTAL (CORRECTED)	145,604	39			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The ANOVA table decomposes the variability of Bioacc Car into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on Bioacc Car at the 95,0% confidence level.

**Taula 2. Multiple Range Test for Carotenoid Bioaccessibility by Oli**

*Method: 95,0% LSD*

Oli	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
NO	10	0,8919	0,475874	X
G	10	2,5619	0,475874	X
C	9	2,63599	0,502315	X
O	11	3,79017	0,454246	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C – G	0,0740893	1,40471
C – NO	*1,74409	1,40471
C – O	-1,15418	1,37316
G – NO	*1,67	1,36624
G – O	-1,22827	1,33556
NO – O	*-2,89827	1,33556

\* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor. This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no.



**Taula 3. Analysis of Variance for Lycopene Bioaccessibility – Type III Sums of Squares.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<i>MAIN EFFECTS</i>					
A: Maduresa	15,436	1	15,436	8,82	0,0056
B: Oli	39,8933	3	13,2978	7,60	0,0006
<i>INTERACTIONS</i>					
AB	12,7867	3	4,26223	2,44	0,0828
RESIDUAL	56,0004	32	1,75001		
TOTAL (CORRECTED)	129,531	39			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor. The ANOVA table decomposes the variability of Bioacc Lyc into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on Bioacc Lyc at the 95,0% confidence level.

**Taula 4. Multiple Range Tests for Lycopene Bioaccessibility by Oli.**

*Method: 95,0% LSD*

Oli	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
NO	10	0,6618	0,443322	X
G	10	1,5328	0,443322	X
C	9	2,19098	0,467955	X
O	11	3,41399	0,423174	X
Contrast		Difference	+/- Limits	
C – G		0,658183	1,30862	
C – NO		*1,52918	1,30862	
C – O		-1,223	1,27923	
G – NO		0,871	1,27278	
G – O		*-1,88119	1,2442	
NO – O		*-2,75219	1,2442	

\* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor. This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 3 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

**Taula 5. Analysis of Variance for Antioxidant Capacity – Type III Sums of Squares.**

<b>Source</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>P-Value</b>
<i>MAIN EFFECTS</i>					
A: Maduresa	827,153	2	413,576	4,75	0,0136
B: Oli	111,309	3	37,1032	0,43	0,7354
<i>INTERACTIONS</i>					
AB	552,199	6	92,0332	1,06	0,4028
RESIDUAL	3832,58	44	87,1041		
TOTAL (CORRECTED)	5333,87	55			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor. The ANOVA table decomposes the variability of AC into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since one P-value is less than 0,05, this factor has a statistically significant effect on AC at the 95,0% confidence level.

**Taula 6. Multiple Range Tests for Antioxidant Capacity by Maduresa.**

*Method: 95,0% LSD*

Maduresa	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	18	42,0036	2,21937	X
2	18	43,3177	2,21167	X
3	20	50,6454	2,09399	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-1,31411	6,2815
1 - 3	*-8,64185	6,12871
2 - 3	*-7,32773	6,11748

\* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor. This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

**Taula 7. Multiple Range Tests for Antioxidant Capacity by Oli**

*Method: 95,0% LSD*

Oli	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
NO	14	43,1557	2,50606	X
G	13	44,9723	2,60074	X
C	16	46,0417	2,34383	X
O	13	47,1191	2,60074	X
Contrast		Difference	+/- Limits	
C – G		1,07741	7,03629	
C – NO		2,14685	7,37764	
C – O		3,96347	7,2469	
G – NO		1,06944	7,03629	
G – O		2,88606	6,90039	
NO – O		1,81663	7,2496	

\* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor. This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.